

Analyse der Enzymaktivitäten von OxPhos-Komplexen / Superkomplexen und Veränderungen des mitochondrialen Proteoms in Bezug auf Alter und Kalorienrestriktion

Zur Erlangung des akademischen Grades eines Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat) vorgelegte Dissertation von Dipl.-Biophys. Michael Joachim Muschol aus Ludwigshafen am Rhein



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Fachbereich Chemie

AK Prof. Dr. N. A. Dencher



Berichte aus der Biophysik

Michael Joachim Muschol

**Analyse der Enzymaktivitäten von
OxPhos-Komplexen / Superkomplexen und
Veränderungen des mitochondrialen Proteoms
in Bezug auf Alter und Kalorienrestriktion**

Zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
vorgelegte Dissertation von
Dipl.-Biophys. Michael Joachim Muschol
aus Ludwigshafen am Rhein

D 17 (Diss. TU Darmstadt)

Shaker Verlag
Aachen 2015

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Darmstadt, Techn. Univ., Diss., 2014

Copyright Shaker Verlag 2015

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-3456-1

ISSN 1439-7897

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

**Analyse der Enzymaktivitäten von OxPhos-Komplexen / Superkomplexen
und Veränderungen des mitochondrialen Proteoms in Bezug auf Alter und
Kalorienrestriktion**

Vom Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Darmstadt
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigte

Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Biophys. Michael Joachim Muschol
aus Ludwigshafen am Rhein

Referent: Prof. Dr. Norbert A. Dencher

Korreferent: Prof. Dr. Gerhard Thiel

Tag der Einreichung: 03. Juni 2014

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Juli 2014

Darmstadt 2014

D17



Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Prof. Dr. N. A. Dencher in der Zeit von September 2010 bis Juli 2014 im Fachbereich Chemie am Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt angefertigt.



Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Publikation

N. Castelein, M. Muschol, I. Dhondt, H. Cai, W. H. De Vos, N. A. Dencher, B. P. Braeckman
Mitochondrial efficiency is increased in axenically cultured Caenorhabditis elegans
Exp Gerontol (2014), doi: 10.1016/j.exger.2014.02.009

Posterpräsentationen

International Conference of Systems Biology, Heidelberg/Mannheim 2011

Age-related changes in abundance, posttranslational modification and supramolecular assembly of OxPhos enzymes in Podospora anserina

M. Muschol, E. R. Schäfer, H. Seelert, N. A. Dencher, A. Poetsch, S. Rexroth, M. Rögner, A. Hamann, A. Werner, H. D. Osiewacz

Molecular Life Sciences, Frankfurt 2011

Age-related changes in abundance, posttranslational modification and supramolecular assembly of OxPhos enzymes in Podospora anserina

M. Muschol, E. R. Schäfer, H. Seelert, N. A. Dencher, A. Poetsch, S. Rexroth, M. Rögner, A. Hamann, A. Werner, H. D. Osiewacz

Conference of Systems Biology of Mammalian Cells, Leipzig 2012

Age-related changes in the mitochondrial lipidome as well as in the abundance, activity and supramolecular assembly of OxPhos enzymes

M. Muschol, O. Ankudin, A. Atenhaf, B. Becker, K. Brahm, M. Frenzel, M. Saager, E. R. Schäfer, H. Seelert, A. Hamann, A. Werner, H. D. Osiewacz, N. A. Dencher

Systems Biology of Human Disease, Heidelberg 2012

Age-related changes in abundance, activity and supramolecular assembly of OxPhos enzymes in Podospora anserina

M. Muschol, A. Atenhaf, K. Brahm, E. R. Schäfer, H. Seelert, N. A. Dencher, A. Hamann, A. Werner, H. D. Osiewacz

Meeting of the German Foundation for Aging Research, Hofheim/Taunus 2012

Age-related changes in abundance, activity and supramolecular assembly of OxPhos enzymes in Podospora anserina

M. Muschol, E. R. Schäfer, N. A. Dencher, A. Hamann, A. Werner, H. D. Osiewacz

Workshop GerontoMitoSys, Hofheim/Taunus 2012

Age-related changes in abundance, activity and supramolecular assembly of OxPhos enzymes in Podospora anserina

M. Muschol, E. R. Schäfer, N. A. Dencher, A. Hamann, A. Werner, H. D. Osiewacz

64. Mosbacher Kolloquium – „Membranes in Motion“, Mosbach (Baden) 2013

Age-related changes in abundance, activity and supramolecular assembly of OxPhos enzymes in Podospora anserina

M. Muschol, E. R. Schäfer, N. A. Dencher, A. Hamann, A. Werner, H. D. Osiewacz

Vorträge

Conference of Systems Biology of Mammalian Cells, Leipzig 2012

Brain area specific mitochondrial ageing – Alterations of the proteome, interactome and metabolome

N. A. Dencher, M. Frenzel, H. Rommelspacher, M. D. Sugawa

Seventh Conference of the International Coenzyme Q₁₀ Association, Sevilla, Spanien 2012

CoQ10-mediated Performance of the Respiratory Chain is Modulated by Age, Diseases and Calorie Restriction via Super-Assembly of OxPhos Complexes

N. A. Dencher, A. Atenhan, B. Becker, K. Brahm, M. Frenzel, M. Kratochwil, M. Muschol, E. R. Schäfer, S. Thilmany, M. D. Sugawa

International Symposium on Aging (ISOA-2012) and 16th Biennial Conference of Association of Gerontology (India), Shillong, Meghalaya, Indien 2012

On the avenue to a systems biological description of mitochondrial ageing

N. A. Dencher, E. R. Schäfer, M. Muschol, A. Atenhan, B. Becker, K. Brahm, M. Frenzel, M. Saager, H. Seelert, A. Poetsch, S. Rexroth, M. Rögner, A. Kowald, E. Klipp, A. Hamann, A. Werner, H. D. Osiewacz

International Symposium of Asian Association of Aging Research - Biology of Aging and Disorders, Fukuoka, Japan 2012

Age-related changes in abundance, activity, posttranslational modification and supramolecular assembly of OxPhos enzymes

N. A. Dencher, E. R. Schäfer, M. Muschol, A. Atenhan, B. Becker, K. Brahm, M. Frenzel, M. Saager, H. Seelert, A. Poetsch, S. Rexroth, M. Rögner, A. Hamann, A. Werner, H. D. Osiewacz

Recent Insights in Mitochondrial Evolution Applied to Health and Ageing, Leiden, Niederlande 2013

Evolutionary-conserved modulation of the organisation and performance of the respiratory chain during ageing and healthy ageing

N. A. Dencher

Sino-German Symposium on "Molecular Systems Approaches to Aging", Shanghai, China 2013

On the avenue to a systems biological description of mitochondrial ageing

N. A. Dencher, L. Cavlovic, V. Decker, M. Frenzel, M. Muschol, E. R. Schäfer, H. Seelert, A. Poetsch, S. Rexroth, M. Rögner, S. Goto, I. Shimokawa, A. Hamann, A. Werner, H. D. Osiewacz, M. D. Sugawa

20th IAGG World Congress of Gerontology and Geriatrics, Seoul, Südkorea 2013

Evolutionary Conserved Alterations by Age and Calorie Restriction of the Organization and Performance of the Respiratory Chain

N. A. Dencher, M. Frenzel, M. Kratochwil, M. Muschol, E. R. Schäfer, H. Seelert, S. Thilmany, S. Goto, H. D. Osiewacz, I. Shimokawa, M. D. Sugawa



Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Norbert A. Dencher für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für die freundliche Überlassung des interessanten Promotionsthemas danken. Die hilfreiche Unterstützung, insbesondere bei der Probenbeschaffung im Rahmen des BMBF-Projekts GerontoMitoSys sowie die konstruktiven fachlichen Diskussionen haben erheblich zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. G. Thiel danke ich für die Übernahme des Korreferats und die Anregungen, die ich im Rahmen des Graduiertenkollegs 1657 (Strahlenbiologie) erhalten habe.

Ein besonderer Dank geht an Natascha Castelein aus der Arbeitsgruppe Prof. Dr. B. P. Braeckman, Fachbereich Biologie, Universität Gent, Belgien, für die Bereitstellung von Mitochondrien aus *Caenorhabditis elegans* unterschiedlicher Altersstufen und Ernährungszustände sowie für den wissenschaftlichen Austausch, der zu einer gemeinsamen Publikation führte.

Weiterhin möchte ich der Arbeitsgruppe Molekulare Entwicklungsbiologie, Institut für Molekulare Biowissenschaften, Fachbereich Biowissenschaften, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt unter der Leitung von Prof. Dr. H. D. Osiewacz für das zur Verfügung stellen von Mitochondrien aus *Podospora anserina* unterschiedlicher Altersstufen danken. Vorrangig müssen dabei Dr. A. Hamann für die Koordination der Zusammenarbeit und A. Werner für die Anzucht der Pilze und die Isolierung der Mitochondrien genannt werden.

Bedanken möchte ich mich auch bei Rita Vitale aus der Arbeitsgruppe Prof. Dr. A. Corcelli, Fachbereich Medizinwissenschaften, Universität Bari, die mir bei der Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie so ausdauernd Rede und Antwort gestanden hat.

Ein besonderer Dank gilt PD Dr. H. Seelert, der den ganzen Arbeitskreis stets geduldig und hilfsbereit als Post-Doc begleitet hat. Es ist schade, dass wir nicht länger miteinander arbeiten konnten.

Der nächste Dank geht an alle, die während meiner Promotionsdauer für die Organisation des Arbeitskreises verantwortlich waren und ihn "am Laufen hielten": Christine Schröpfer, Sabine Reinhold, Elizabeth Trapp, Michaela Fröhlich und Edith Hiemenz. Eure Unterstützung, sei es im Labor, im Büro, bei Bestellungen oder in Form einer Erinnerung an die vergessene Reisekostenabrechnung gewährleistete immer eine angenehme Arbeitsatmosphäre.

Nun folgt die Danksagung an alle, die dazu beigetragen haben, dass der Arbeitskreis Dencher wohl eine der harmonischsten Arbeitsgruppen der TU Darmstadt ist. Angefangen von denen, die bereits vor mir da waren (Monika Frenzel, Eva Regine Schäfer, Sandra Thilmany, Nico Heidrich) über Manuela Kratochwil, die zusammen mit mir ihre Promotion begonnen hat bis zu denen, die nach mir kamen (Lidija Cavlovic, Victoria Decker, Tamara Dzinic, Sven Marx) sowie bei Katarzyna Kuter, die sich mit ihrer guten Laune nahtlos in den Arbeitskreis eingefügt hat, möchte ich allen herzlich für die schöne Zeit danken! Insbesondere die vielen Kuchen werde ich nicht vergessen.

Auf meinem Weg wurde ich auch von zahlreichen Studenten begleitet, die mit mir zusammen und unter meiner Betreuung im Labor gearbeitet und sich dabei ihre Studienabschlüsse

verdient haben: Olga Ankudin, Anne Atenhan, Meral Azakli, Laura Babel, Stefanie Kemski, Bastian Becker und Kevin Brahm. Auch Victoria Petermann sowie Stefanie und Christine Kern möchte ich recht herzlich danken.

Der größte Dank gilt jedoch meinen Eltern. Ohne sie wäre ich niemals in der Lage gewesen überhaupt so weit zu kommen. Ihrer Unterstützung über die Jahre hinweg ist es zu verdanken, dass ich die Gelegenheit hatte meine Ziele, auch in privater Hinsicht, zu verwirklichen.

Der letzte Dank gilt meiner Frau Cornelia. Sie begleitet mich bereits seit 13 Jahren auf meinem Lebensweg. Die vorliegende Arbeit hat sie wohl noch mehr Nerven gekostet als mich. Ich danke dir für deine Unterstützung und dafür, dass du mich auch in schwierigen Zeiten noch zum Lachen bringen kannst. Ich liebe dich.

Es kommt nicht darauf an,

wie **alt** man wird,

sondern **wie** man alt wird.

Werner Mitsch

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Summary.....	5
3	Einleitung.....	9
3.1	Der Mechanismus des Alterns.....	9
3.2	Kalorienrestriktion	13
3.3	Intention der Arbeit	18
3.4	Die Atmungskette	20
4	Materialien.....	24
4.1	Chemikalien	24
4.2	Geräte.....	26
4.3	Verbrauchsmaterialien.....	28
4.4	Software	28
4.5	Organismen	29
4.5.1	<i>Bos primigenius taurus</i>	29
4.5.2	<i>Podospora anserina</i>	29
4.5.3	<i>Caenorhabditis elegans</i>	32
5	Methoden	33
5.1	Solubilisierung von Membranproteinen für die Gelelektrophorese	33
5.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	33
5.2.1	Blau-native (BN) und farblos-native (CN) PAGE.....	33
5.2.2	2D-SDS-PAGE	34
5.3	Gelfärbemethoden.....	35
5.3.1	Coomassie-Färbung	35
5.3.2	Silber-Färbung	35
5.3.3	Sypro Ruby-Färbung	35
5.4	Enzymaktivitätstests.....	36
5.4.1	In-Gel Aktivitätstest.....	36
5.4.1.1	NADH : Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I).....	36
5.4.1.2	Ubichinol : Cytochrom c-Oxidoreduktase (Komplex III ₂).....	36
5.4.1.3	Cytochrom c : O ₂ -Oxidoreduktase (Komplex IV)	37
5.4.1.4	F ₀ F ₁ -ATP-Synthase (Komplex V)	37
5.4.2	Quantitativer In-Gel Aktivitätstest.....	37
5.4.3	In-Lösung Aktivitätstest	39
5.4.3.1	NADH : Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I).....	40
5.4.3.2	Ubichinol : Cytochrom c-Oxidoreduktase (Komplex III ₂).....	41
5.4.3.3	Cytochrom c : O ₂ -Oxidoreduktase (Komplex IV)	42
5.5	Quantifizierung von Proteinen	43
5.6	Massenspektrometrie	44
5.6.1	Peptide mass fingerprinting (PMF).....	45
5.6.2	Lipidanalytik	45
5.7	Statistik	47

5.8	Aufbau eines ns-Blitzlicht-Absorptionsspektrophotometers	47
6	Ergebnisse und Diskussion	53
6.1	Enzym Aktivitätstests	53
6.1.1	In-Gel Aktivitätstest	53
6.1.1.1	In-Gel Aktivitätstest für die Atmungskettenkomplexe I, IV und V	53
6.1.1.2	In-Gel Aktivitätstest - Inhibierung der Atmungskettenkomplexe	55
6.1.1.3	In-Gel Aktivitätstest - Inhibierung der Superkomplexe	56
6.1.1.4	Quantitativer In-Gel Aktivitätstest	58
6.1.1.4.1	Quantitativer In-Gel Aktivitätstest - Kontrollexperiment zur Entfärbung	58
6.1.1.4.2	Quantitativer In-Gel Aktivitätstest Komplex I - <i>Podospora anserina</i>	62
6.1.1.4.3	Quantitativer In-Gel Aktivitätstest Komplex III ₂	64
6.1.1.4.3.1	Quantitativer In-Gel Aktivitätstest Komplex III ₂ mittels CN-PAGE	65
6.1.1.4.3.2	Quantitativer In-Gel Aktivitätstest Komplex III ₂ mittels hrCN-PAGE	66
6.1.1.4.3.3	Quantitativer In-Gel Aktivitätstest Komplex III ₂ mittels BN-PAGE	67
6.1.1.4.3.4	Quantitativer In-Gel Aktivitätstest Komplex III ₂ - <i>Podospora anserina</i>	69
6.1.1.4.4	Quantitativer In-Gel Aktivitätstest Komplex IV - <i>Podospora anserina</i>	71
6.1.2	In-Lösung Aktivitätstest	75
6.1.2.1	In-Lösung Aktivitätstest Komplex I	76
6.1.2.1.1	In-Lösung Aktivitätstest Komplex I - Beispiel einer Kinetik	76
6.1.2.1.2	In-Lösung Aktivitätstest Komplex I - Inhibierung der Atmungskettenkomplexe	76
6.1.2.1.3	In-Lösung Aktivitätstest Komplex I - Einfluss der Proteinmenge	78
6.1.2.1.4	In-Lösung Aktivitätstest Komplex I - <i>Podospora anserina</i>	79
6.1.2.2	Performance von Komplex I	81
6.1.2.3	In-Lösung Aktivitätstest Komplex III ₂ - <i>Podospora anserina</i>	82
6.1.2.4	In-Lösung Aktivitätstest Komplex IV	88
6.1.2.4.1	In-Lösung Aktivitätstest Komplex IV - Einfluss der Proteinmenge	89
6.1.2.4.2	In-Lösung Aktivitätstest Komplex IV - <i>Podospora anserina</i>	90
6.1.2.5	Performance von Komplex IV	94
6.1.3	Altersabhängigkeit der Enzymaktivität und der Effizienz der Atmungskette	94
6.2	Quantitative Analyse der Atmungskettenkomplexe von <i>Caenorhabditis elegans</i> in Abhängigkeit vom Ernährungszustand und Alter	100
6.2.1	Ermittlung des optimalen Detergens-zu-Protein-Verhältnis	103
6.2.2	2D-BN/SDS-PAGE - <i>Caenorhabditis elegans</i>	105
6.2.2.1	Komplex V	106
6.2.2.1.1	Komplex V - Monomer	106
6.2.2.1.2	Komplex V - Dimer	108
6.2.2.1.3	Komplex V - Gesamtmenge	110
6.2.2.1.4	Komplex V - Monomer-Dimer-Verhältnis	111
6.2.2.1.5	Komplex V - freier F ₁ -Teil	111
6.2.2.2	Komplex IV	113
6.2.2.3	Komplex III ₂	115
6.2.2.3.1	Komplex III ₂ - Homodimer	116
6.2.2.3.2	Komplex III ₂ - Superkomplex b und c	117
6.2.2.3.3	Komplex III ₂ - Gesamtmenge	121
6.2.2.4	Komplex I	122
6.2.3	Analyse der Atmungskettenkomplexe von <i>Caenorhabditis elegans</i> in Abhängigkeit vom Ernährungszustand und Alter	124

6.3	Analyse mitochondrialer Lipide mittels MALDI-TOF MS.....	128
6.3.1	Massenkalibrierung des Spektrums.....	130
6.3.2	Quantifizierung des Lipids Cardiolipin	136
6.3.3	Analyse mitochondrialer Lipide von OLN-93 Zellen	140
6.3.4	MALDI-TOF in Verbindung mit der Matrix 9-AA als analytische Methode zur Quantifizierung von mitochondrialen Lipiden.....	142
7	Abkürzungsverzeichnis	144
8	Literatur	147
	Anhang	161